



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 03 895 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/48
C 12 N 9/10

⑳ Aktenzeichen: 199 03 895.3
㉔ Anmeldetag: 1. 2. 1999
㉔ Offenlegungstag: 3. 8. 2000

DE 199 03 895 A 1

㉑ Anmelder:
Johnsson, Kai, Dr., 44801 Bochum, DE

㉒ Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

US 57 23 584 A
US 51 28 476 A
WO 95 19 445 A1
WO 95 04 069 A1

WILCHEK, Meir, BAYER, Edward A.: Avidin-Biotin
Technology, Academic Press, Inc., San Diego,
et.al., Vol.184, 1990, S.7;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Selektive Immobilisierung und Nachweis der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase in der aktiven Form

DE 199 03 895 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase ist ein wichtiges DNA-Reparaturenzym und spielt außerdem eine große Rolle in der Chemotherapie von Krebs durch DNA-alkylierende Medikamente, da resistente Tumore häufig die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase überexprimieren (A. E. Pegg et al., *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 51, 167). Der einfache und hochsensitive Nachweis aktiver O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase, beispielsweise in Tumorgewebe, ist deshalb wünschenswert. Der am weitesten verbreitete Assay zum Nachweis aktiver O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase funktioniert über den Einsatz radioaktiv markierter O⁶-Alkylguanin-DNA-Derivate, bei der die Übertragung der Radioaktivität von der DNA auf das Enzym verfolgt wird (siehe beispielsweise N. H. Zaidi et al., *Clinical Cancer Research* 1996, 2, 577 und darin zitierte Arbeiten). Dieser Assay ist jedoch sehr zeitaufwendig und auf Grund der eingesetzten radioaktiven Materialien nur in spezialisierten Labors durchzuführen. Dies erhöht natürlich auch den Preis des Assays.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein einfaches, empfindliches Verfahren zum Nachweis aktiver O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase zu ermöglichen, das auch automatisiert werden kann und in der Durchführung keine höheren Anforderungen an das Personal stellt.

Das hier beschriebene Verfahren beruht darauf, daß durch die Verwendung von O⁶-Alkylguanin-Derivaten (2) (eingebaut entweder in Oligonucleotide oder als Nucleoside und Nucleotide) als Substrate der humanen O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase eine chemische Gruppe X (4) kovalent mit der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (1) verknüpft wird und somit die darauffolgende Immobilisierung der modifizierten O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (3) über die Gruppe X (4) an einer Oberfläche erlaubt. Die immobilisierte O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (1) kann dann durch immunchemische Verfahren oder spektroskopische Techniken nachgewiesen werden.

Dieses Verfahren benötigt wenige Stunden bis das Testresultat vorliegt, stellt keine hohen Anforderungen an das ausführende Personal, benötigt lediglich ein minimalen apparativen Aufwand, kommt ohne Radioaktivität aus und ist auch für die Automatisierung (insbesondere mit Mikrotiterplatten) geeignet. Weiterhin ist das Verfahren in der Empfindlichkeit mit radioaktiven Assays vergleichbar. Darüber hinaus ist der Assay für das Screening von chemischen Bibliotheken nach neuen Inhibitoren der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase geeignet.

Beispiel

Die der selektiven Immobilisierung zu Grunde liegende Chemie ist in den Zeichnungen Fig. 1, Fig. 2 und Fig. 3 verdeutlicht. Die hier vorliegenden Protokolle beruhen auf der Immobilisierung rekombinanter, humaner O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) über Biotin/Streptavidin-Wechselwirkungen, nachdem hAGT durch eine irreversible Reaktion mit den Substraten (5a) und (5b) biotinyliert wurde. Die Detektion immobilisierter hAGT erfolgt nach immunochemischen Methoden durch einen Antikörper gegen einen an die hAGT N-terminal angefügten 6xHis-Tag. Die Protokolle dienen nur als Beispiele für die generelle Durchführbarkeit des beschriebenen Verfahrens.

Selektive Immobilisierung von hAGT mit dem Nucleosid (5b)

Der Reaktionsansatz mit 1.2 nmol hAGT und 1.2 nmol (5b) in 100 µl TRIS-Puffer [50 mM TRIS-Cl, pH 7,6; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 200 µg/ml BSA] inkubiert für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die anschließende Verdünnung des Reaktionsansatzes mit PBST (phosphate buffered saline mit 0,05% Tween 20) enthielt 10 µmol hAGT in 300 µl Gesamtvolumen, entsprechend dem Volumen der Streptavidin-bedeckten Oberfläche der einzelnen Mikrotiterplatten-Vertiefungen, welche zuvor für eine Stunde mit 3%iger Trockenmilch-Lösung geblockt worden waren.

Nach der einstündigen Inkubation der Verdünnung in den Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten-Vertiefungen bei Raumtemperatur wurde jeweils dreimal mit PBST bzw. PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Anschließend wurden 300 µl des Anti-6xHistag-Antikörpers (Wirtsspezies: Maus) in einer 1 : 1000 Verdünnung in PBST (mit 1% BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur in die Vertiefungen gegeben. Nachdem erneut dreimal mit PBST und dreimal mit PBS gewaschen worden war, erfolgte die Inkubation mit 300 µl eines sekundären Antikörper-Peroxidase-Konjugats (Anti-Maus IgG Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) in einer 1 : 1000 Verdünnung in PBST (mit 1% BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Vor der Zugabe der Substratlösung [1 mg/ml ABTS in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4; 3 µl 30%iger H₂O₂-Lösung in 10 ml Substratlösung] wurde nochmals dreimal mit PBST bzw. PBS gewaschen. Die Reaktion der Peroxidase wurde über die Änderung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm über einen Zeitraum von 1,5 Stunden mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers bestimmt.

2. Protokoll

Selektive Immobilisierung von hAGT mit dem in Oligonucleotide eingebauten Nucleosid (5a)

Zur Darstellung des Substrats wurde das Nucleosid (5a) (über das geschützte Phosphoramidid) in ein 20 Basenpaare langes Oligonucleotid eingebaut, welches nach der Hybridisierung mit dem komplementären Strang in doppelsträngiger Form vorlag.

Der Reaktionsansatz enthielt 10 µmol hAGT und 10 µmol doppelsträngiges Oligonucleotidsubstrat in 100 µl TRIS-Puffer [50 mM TRIS-Cl, pH 7,6; 10 mM DTT; 1 mM; EDTA; 200 µg/ml BSA] und wurde nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf 300 µl Gesamtvolumen mit PBST aufgefüllt. Danach wurde die Verdünnung in die Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten gegeben, welche zuvor für eine Stunde mit 3-%iger Trockenmilch-Lösung geblockt worden waren.

Die Detektion immobilisierter hAGT erfolgte mit den gleichen immunochemischen Methoden wie in Protokoll 1.

Protokoll 3

Selektive Immobilisierung von hAGT mit dem in Oligonucleotide eingebauten Nucleosid (5a) und Detektion über Chemilumineszenz

Es wurde dasselbe Oligonucleotid wie in Protokoll 2 verwendet.

Die Reaktionsansätze enthielten 0,2–1 µmol hAGT und jeweils 5 µmol doppelsträngiges Oligonucleotidsubstrat in

100 µl TRIS-Puffer [50 mM TRIS-Cl; pH 7,6; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 200 µg/ml BSA] und wurden nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf 50 µl Gesamtvolumen mit PBST aufgefüllt. Danach wurden die Verdünnungen in die Mikrotiterplatten gegeben, welche zuvor für eine Stunde mit 3%iger Trockenmilch-Lösung geblockt worden waren. Nach der einstündigen Inkubation der Verdünnungen in den Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten-Vertiefungen bei Raumtemperatur wurde jeweils zweimal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 µl des Anti-6xHis-tag-Antikörpers (Wirtsspezies: Maus) in einer 1 : 1000 Verdünnung in PBST (mit 1 BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur in die Vertiefungen gegeben. Nachdem erneut dreimal mit PBST und dreimal mit PBS gewaschen worden war, erfolgte die Inkubation mit 50 µl eines sekundären Antikörper-Peroxidase-Konjugats (Anti-Maus IgG Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) in einer 1 : 1000 Verdünnung in PBST (mit 1% BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Vor der Zugabe von 50 µl der Substratlösung [ECL-Detektionslösung; Amersham LIFE SCIENCE] wurde nochmals zweimal mit PBST und einmal PBS gewaschen. Die Reaktion der Peroxidase wurde über Chemilumineszenz über einen Detektionszeitraum von zwei Stunden mit Hilfe eines FluorS-Imagers (Biorad) verfolgt.

gen kann (siehe Fig. 3).

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Patentansprüche

1. Verfahren zur selektiven Immobilisierung des, Enzyms O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (1) auf Oberflächen und der darauffolgenden Detektion der immobilisierten O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (1) durch immunochemische Nachweisverfahren oder spektroskopische Techniken, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch die Verwendung von O⁶-(Alkyl-X)-guanin-Derivaten (2) (eingebaut entweder in Oligonucleotide oder als Nucleoside und Nucleotide) als Substrate der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase eine chemische Gruppe X (4) kovalent vom O⁶-(Alkyl-X)-guanin-Derivat (2) auf die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (1) übertragen wird und somit die darauffolgende Immobilisierung der modifizierten O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (3) über die Gruppe X (4) an einer Oberfläche erlaubt. Die chemische Gruppe X (4) ist hierbei als eine Gruppe definiert, die eine selektive kovalente oder nicht-kovalente Bindung mit einem anderem, auf einer Oberfläche befindlichen, Molekül erlaubt. (siehe Fig. 1).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch, die Verwendung von über die O⁶-Alkylgruppe biotinylierten O⁶-Alkylguanin-Derivaten (5a) oder (5b) (eingebaut entweder in Oligonucleotide oder als Nucleoside und Nucleotide) als Substrate der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase eine Biotin-Gruppe vom biotinylierten O⁶-Alkylguanin-Derivat (5a) oder (5b) kovalent auf die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase übertragen wird und somit die Immobilisierung der modifizierten O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (6) auf Streptavidin-beschichteten Oberflächen (7) erlaubt (siehe Fig. 2).
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase direkt mit einem Marker (8) (beispielsweise einem Enzym oder einem Fluoreszenz-Farbstoff) kovalent gekoppelt ist, so daß nach Immobilisierung nach Anspruch 1 oder 2 ein direkter Nachweis der immobilisierten O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase erfol-

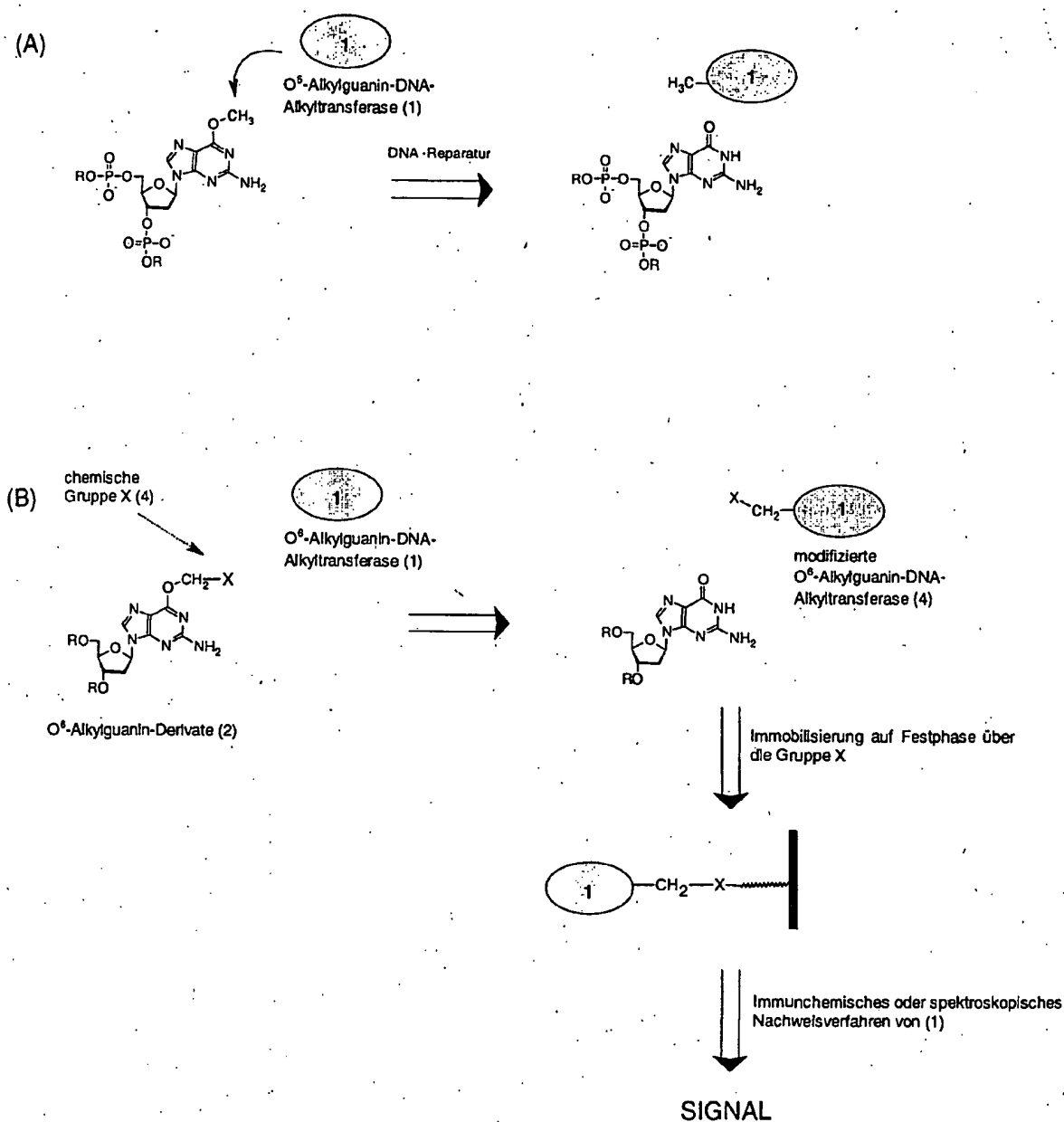
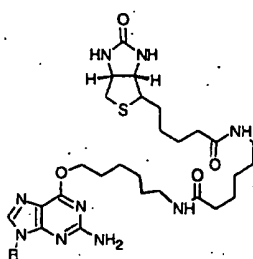
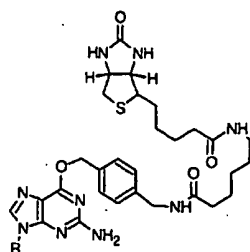


Fig. 1: A) Mechanismus der O⁶-Alkylguanine-DNA-Alkyltransferase (1);
 B) Immobilisierung von (1) nach Anspruch 1.

(A)



(5a)



(5b)

R = chemischer Rest, so daß es sich bei (5) um ein Nucleosid, Nucleotid oder Oligonucleotid handelt.

(B)

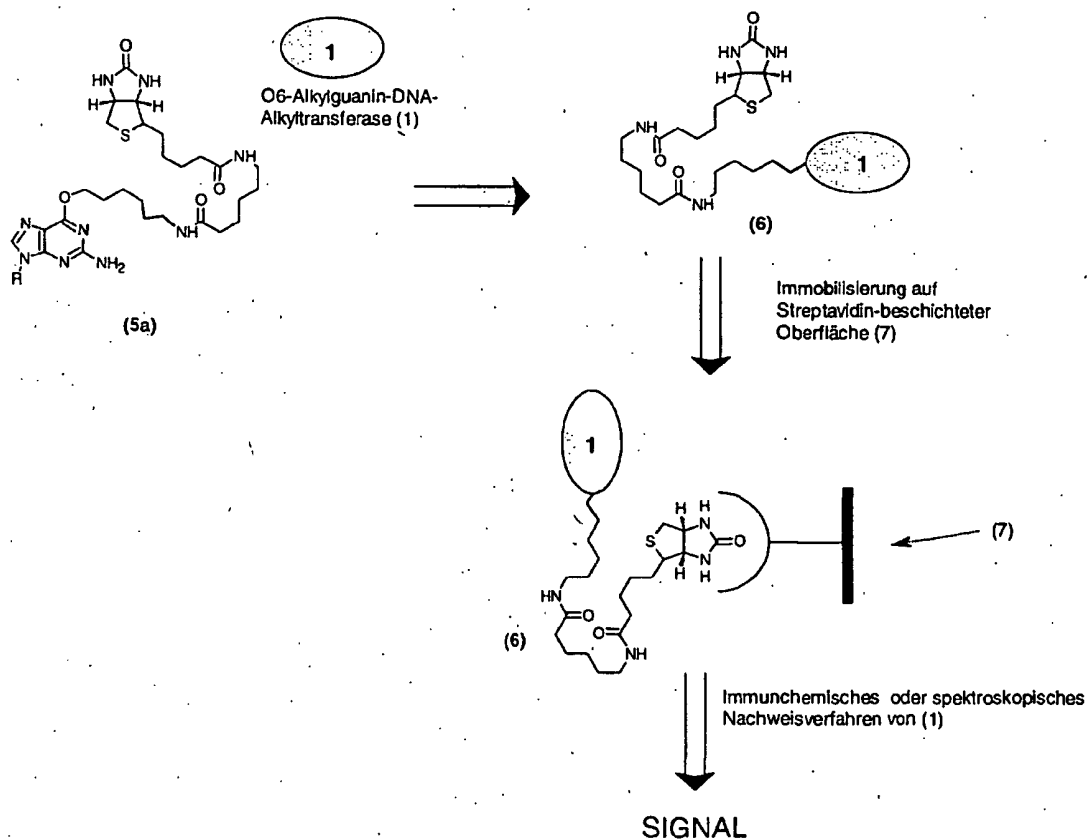


Fig. 2: A) Biotinylierten O⁶-Alkylguanin-Derivate (5a) und (5b); B) Immobilisierung von (1) nach Anspruch 2.

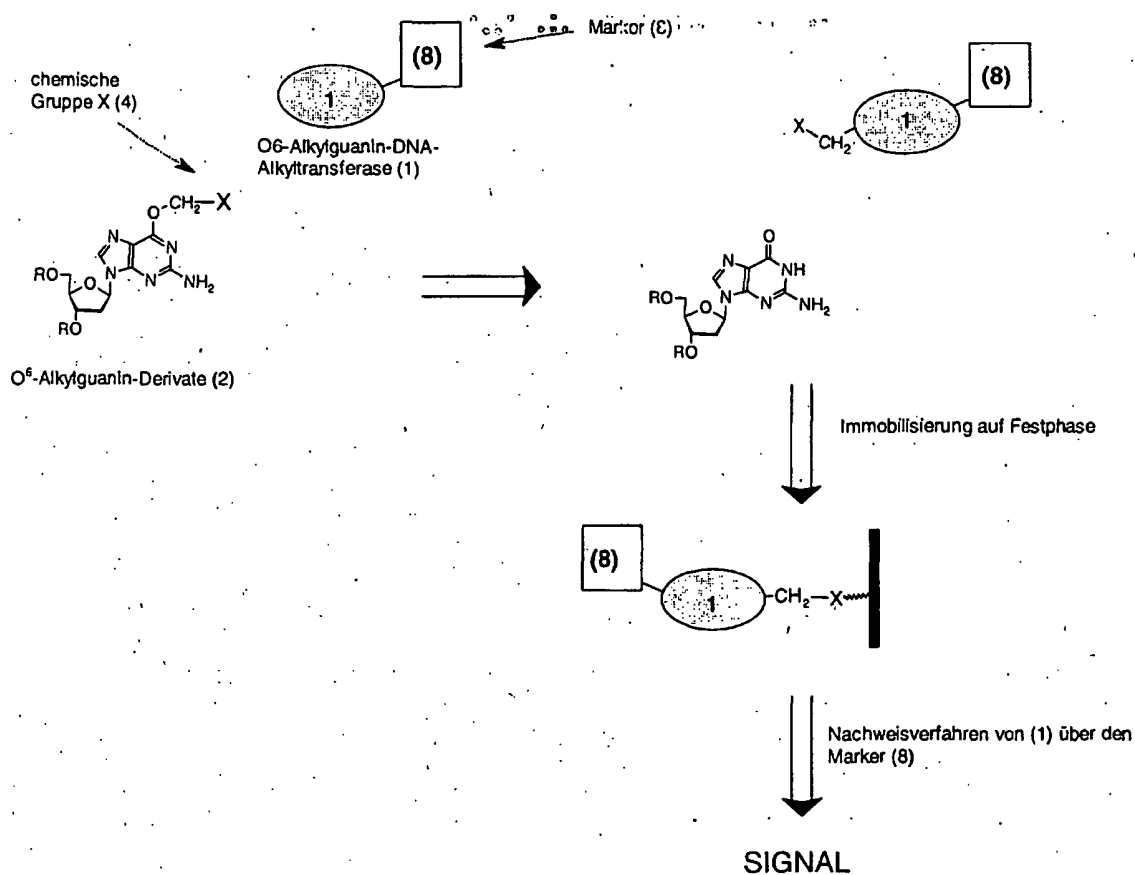


Fig. 3: Nachweis von (1) mit Hilfe eines Markers (8) nach Anspruch 3